

**САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ**

**Физический Факультет**

**Кафедра молекулярной биофизики и физики полимеров**



**Андреева Анастасия Алексеевна**

## **Влияние лигандов координационных соединений платины и палладия на структуру их комплексов с молекулой ДНК**

Выпускная квалификационная работа

Специальность: 011200 – физика

**Научный руководитель:**

доктор физико-математических наук, профессор

**Касьяненко Нина Анатольевна**

**Рецензент:**

кандидат физико-математических наук,

**Меркурьева Анна Александровна**

Санкт-Петербург

2017

## Оглавление

<b>Введение .....</b>	<b>3</b>
<b>Глава 1. ....</b>	<b>5</b>
Взаимодействие молекулы ДНК с координационными соединениями платины .....	5
1.1 Структура и свойства молекулы ДНК .....	5
1.2 Координационные соединения .....	8
1.3 Координационные соединения платины и их биологическая активность .....	9
1.4 Исследуемые координационные соединения платины и палладия .....	12
<b>Глава 2. ....</b>	<b>13</b>
Методы и материалы.....	13
2.1 УФ-спектрофотометрия .....	13
2.2 Низкоградиентная вискозиметрия .....	15
2.3 Плавление ДНК.....	16
2.4 Люминесценция .....	17
2.5 Материалы .....	18
<b>Глава 3. ....</b>	<b>19</b>
Результаты и их обсуждение.....	19
3.1 Конкурентное связывание.....	19
3.2 Гидродинамический метод.....	21
3.3 Протонирование ДНК в комплексах с препаратами платины. ....	23
3.4 Флуоресценция красителя DAPI в растворах ДНК с препаратами. ....	25
3.5 Плавление ДНК. ....	29
<b>Выводы .....</b>	<b>30</b>
<b>Глава 4. ....</b>	<b>31</b>
Список литературы .....	31

## Введение

Количество диагностированных случаев заболевания раком каждый год увеличивается на 2.5-3% по статистике Всемирной организации здравоохранения. [1] Это связано со свойствами, особенностями строения и развития раковых клеток, и, как следствие, динамикой самого заболевания. Высокая скорость роста злокачественных клеток, сложности ранней диагностики заболевания, распространение клеток из первичного очага в другие ткани, ведущее к метастазированию, – это лишь неполный перечень причин гибели организмов от злокачественных новообразований.

Классическими методами лечения данного вида заболевания являются:

- Хирургическое удаление опухоли
- Лучевая терапия.
- Химиотерапия.

При химиотерапии используются лекарства, направленные против быстрого деления клеток. Вследствие этого, главная функция препаратов, которые использует современная медицина, – полное или частичное уничтожение раковых клеток. Опасность такого подхода заключается в том, что терапия, проводимая посредством таких медикаментов (в частности, содержащих металлы платиновой группы), является разрушительной и для здоровых тканей. Серьезных побочных эффектов такого рода можно было бы избежать, синтезировав препарат, обладающий низкой токсичностью и высокой селективностью в отношении злокачественных клеток. Таким образом, создание подобного лекарства является одной из актуальнейших проблем современной медицины.

В наши дни противоопухолевая химиотерапия использует более ста препаратов и включает в себя несколько групп соединений, имеющих схожее строение и фармадинамику. Молекулярные соединения, сочетание отдельных компонентов которых приводит к образованию сложных ионов или молекул, способных к самостоятельному существованию как в кристалле, так и в растворе, называются комплексными (или координационными) и являются наиболее востребованными медикаментами в этой области.

Такие соединения в растворе содержат группу ионов или нейтральных молекул (лигандов), в определенном порядке размещенных (координированных) вокруг центрального атома (иона) – комплексообразователя. В терапии различных видов опухолей наиболее известным комплексообразователем является платина. Наиболее эффективным препаратом в современной медицине является препарат цисплатин (диаминдихлорплатина в цис-конформации, цис-ДДП),

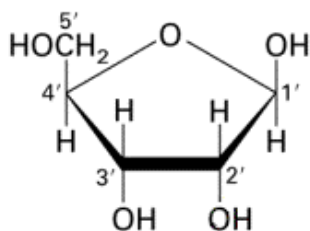
основной мишенью которого является ДНК. Противоопухолевое действие препаратов такого типа происходит за счет их связывания с ДНК. Поэтому логично тестировать новые синтезированные препараты на возможность их взаимодействия с ДНК в растворе. В данной работе представлены результаты исследования взаимодействия двух новых веществ - потенциальных противоопухолевых соединений платины и палладия, обозначенных КМ788 и КМ789, с молекулой ДНК в растворе.

## Глава 1.

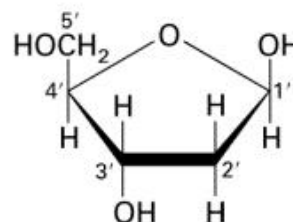
# Взаимодействие молекулы ДНК с координационными соединениями платины

## 1.1 Структура и свойства молекулы ДНК

Основным носителем наследственной информации у всех живых организмов являются нуклеиновые кислоты. В зависимости от того, какой моносахарид присутствует в составе нуклеиновых кислот, их можно разделить на два класса: рибо- либо дезоксирибонуклеиновые кислоты. Рибонуклеиновая кислота (РНК) – молекула, в состав которой входит рибоза, дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) – молекула, в состав которой входит 2-дезоксирибоза.



Рибоза



2-Дезоксирибоза

Рис. 1.1.1 Моносахариды нуклеиновых кислот

На основании данных Р. Франклин по рентгеноструктурному анализу волокон ДНК, в 1953 году ученые Джеймс Уотсон и Фрэнсис Крик предложили модель ДНК. Согласно этой модели, нативная ДНК состоит из двух полимерных цепей, образующих двойную спираль. [2]

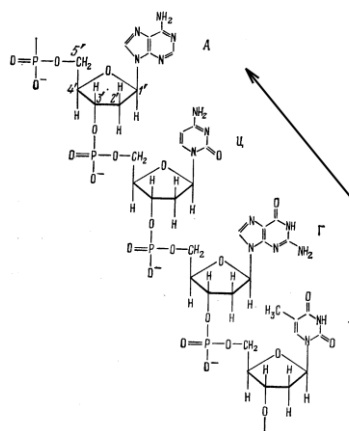


Рис. 1.1.2 Основная цепь ДНК.

Соединения, в которых азотистые основания связаны с рибозой или дезоксирибозой посредством N-гликозидной связи, называются нуклеозидами, а их эфиры с фосфорной кислотой – нуклеотидами.

Нуклеотиды, образованные дезоксирибозой, азотистым основанием и остатком ортофосфорной кислоты, связанные с помощью фосфодиэфирных связей между 5'-углеродом сахара одного и 3'-гидроксигруппой сахара соседнего нуклеотида, являются мономерными звеньями нуклеиновых кислот.

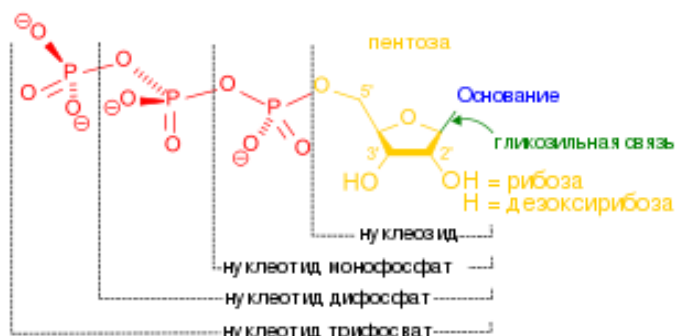


Рис. 1.1.3 Химическое строение нуклеозидов и нуклеотидов

Азотистые основания, которые входят в состав нуклеиновых кислот, относятся к пуриновым или пиримидиновым:

1. Пуриновые основания: аденин и гуанин
2. Пиримидиновые основания: цитозин, урацил, тимин

В состав молекул ДНК входят аденин, гуанин, цитозин и тимин, в РНК вместо тимина входит урацил. Пиримидиновые основания образуют N-гликозидную связь с пентозой (рибозой в РНК и дезоксирибозой в ДНК) через первый атом азота, а пиримидиновые — через девятый.

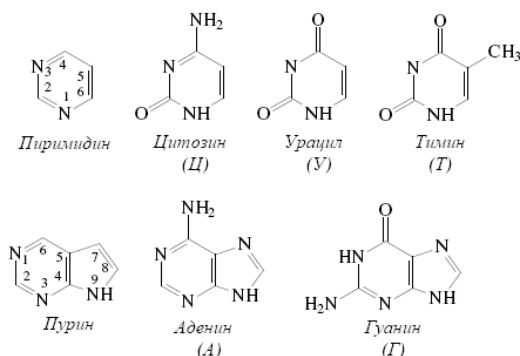


Рис. 1.1.4 Строение пуриновых и пиримидиновых оснований нуклеиновых кислот.

Первичная структура ДНК – это последовательность чередования нуклеотидов в полинуклеотидной цепи. Нуклеотидный состав молекул ДНК подчиняется правилам Чаргаффа – для аденина (А), тимина (Т), цитозина (Ц) и гуанина (Г) справедлива формула:

$$\frac{A + G}{T + C} \approx 1.$$

Так, содержание аденина (А) равно содержанию тимина (Т), а содержание цитозина (Ц) — содержанию гуанина (Г). Таким образом, в ДНК количество пуринов равно количеству пиримидинов. [3]

Азотистые основания направлены внутрь спирали, а их плоскости перпендикулярны оси спирали и параллельны друг другу, - это образует внутри спирали стопку оснований. В стопке между основаниями возникают стэкинг-взаимодействия («стопочные»), которые дополнительно, совместно с Н-связями, способствуют стабилизации структуры двойной спирали в пространстве и имеют гидрофобную природу. [4] Двойная спираль стабилизируется водородными связями между комплементарными основаниями (А-Т или Г-Ц). Пара оснований А-Т стабилизируется двумя водородными связями, а пара Г-Ц — тремя.

В зависимости от степени гидратации, молекулы ДНК могут существовать в двух формах: А и В. А-форма (11 пар оснований на виток, основания наклонены к оси спирали под углом 70°, диаметр спирали 20 Å) существует, когда содержание воды не превышает 40%. Она образуется при дегидратации В-формы ДНК. В-форма ДНК представляет собой классическую уотсон-криковскую двойную спираль и образуется при содержании воды более 40 %. Вторичная структура нативной ДНК в растворе и в клетке – правоспиральная В-форма, для которой характерны наличие большой и малой бороздок, перпендикулярная ориентация плоскостей оснований относительно оси спирали, расстояние между которыми равно 0,34 нм (10 пар оснований приходится на 1 виток спирали, наклон пар оснований к оси спирали составляет 90°, диаметр спирали 20 Å).

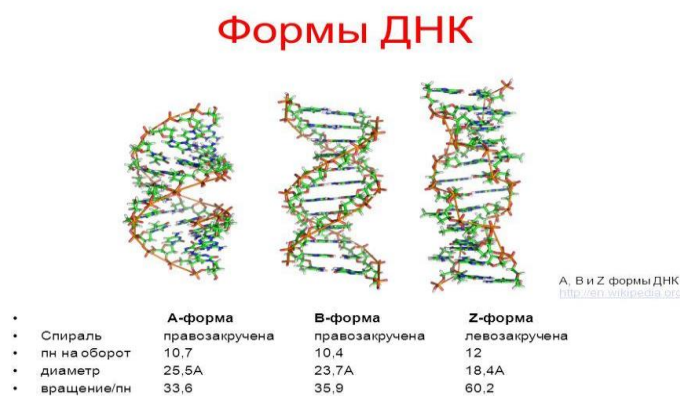


Рис. 1.1.5 Различные формы двуспиральной ДНК

Третичная структура высокомолекулярной ДНК в растворе представляет собой статистический клубок. Практически во всем диапазоне рН молекула ДНК имеет отрицательный заряд на фосфатных группах.

## 1.2 Координационные соединения

Координационные или комплексные соединения представляют собой многочисленный класс неорганических соединений. Данное семейство характеризуется определенной структурой. Наиболее известными представителями этого семейства являются витамин В12, хлорофилл, гемоглобин. Координационные соединения содержат группу ионов или нейтральных молекул (лигандов), в определенном порядке размещенных (координированных) вокруг центрального, обычно положительно заряженного иона – комплексообразователя. В 1893 А. Вернер предложил координационную теорию, удачно описывающую данную группу соединений. Ионы, находящиеся в непосредственной близости от центра, образуют внутреннюю координационную сферу, остальные ионы, находящиеся на более далеком расстоянии, составляют внешнюю координационную сферу. Для удобства записи химических формул центральные лиганды (лиганды внутренней координационной сферы) и центральный ион записывают в квадратных скобках, все остальные лиганды – за квадратными скобками. Примечательно, что при растворении в воде внутренняя сфера сохраняет стабильность, при этом образуя недиссоциирующий комплекс, а остальные ионы диссоциируют:  $K_2[PtCl_6] \rightarrow 2K^+ + [PtCl_6]^{2-}$

Число лигандов, окружающих центральный ион, называется координационным числом. От того, сколько связей образуют лиганды во внутренней сфере, их называют моно-, би- и полидентатными. [5]



### 1.3 Координационные соединения платины и их биологическая активность.

Данный вид молекулярных соединений нашел широкое применение в медицине в качестве противоопухолевых препаратов. В терапии различных видов опухолей комплексообразователем одного из таких соединений является платина.

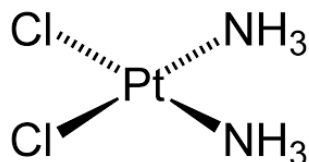


Рис 1.3.1 Координационное соединение – цисплатин

Соединения платины привлекли внимание ученых в 60-х годах двадцатого столетия. Американский химик Барнетт Розенберг в 1965 году открыл цитостатическое действие цисплатина (диаминдихлорплатина в цис-конформации, цис-ДДП) на бактерии *E. Coli*. [6] Главным результатом его исследований стало подтверждение предположения о том, что цисплатин хорошо подходит на роль противоопухолевого препарата. Новизна данного утверждения на тот момент заключалась в том, что все подобные соединения являлись органическими веществами. Продолжая работу в данном направлении, Розенберг экспериментально доказал противоопухолевое действие цис-ДДП на мышах. [7] Таким образом, современная химиотерапия приобрела совершенно новый класс препаратов – неорганические соединения.

Цис-ДДП действует на ДНК как бифункциональный алкилирующий агент. После введения в кровеносное русло один из хлоридных лигандов медленно вытесняется водой в процессе гидратации. Сам аква-лиганд в соединении легко замещается, позволяя атому платины присоединяться ковалентной (координационной) связью к основаниям ДНК. Цис-ДДП может связываться с молекулой ДНК различными способами, в результате взаимодействия образуются межнитевые и внутринитевые сшивки. [8] К примеру, возможно монофункциональное связывание ДНК-Pt-белок. Важно отметить, что из всех оснований ДНК гуанин является более предпочтительным. Позиция N7 гуанина обладает повышенной электроотрицательностью, и за счет своего удобного расположения (она располагается в большой бороздке ДНК) с ней связывается большинство заряженных соединений, которые взаимодействуют в растворе с основаниями ДНК. Дальнейшее связывание платины может происходить путем вытеснения другого лиганда хлора, обычно при помощи другого атома азота гуанина. Цисплатин связывается

ДНК несколькими способами, препятствуя клеточному делению в процессе помощи митоза. Связывание цис-ДДП с ДНК может вызвать дополнительное изгибание двойной спирали и нарушение стэкинга оснований ДНК. Поврежденная ДНК включает механизмы репарации ДНК, а если восстановление оказывается невозможным, то клетка идет на апоптоз. [9]

Открытие противоопухолевых свойств цисплатина породило огромное количество соответствующих исследований в данной области, благодаря которым были установлены такие свойства цис-ДДП, как, например, его антибластическое и цитотоксическое действие. Препарат показал хорошую противоопухолевую и противолейкозную активность при лечении многих злокачественных новообразований, таких, как опухоли, повреждающие яичники, мочевого пузыря, шейки матки и другие. [10] С другой стороны, была выявлена и масса побочных эффектов и негативных влияний цисплатина. Это привело к попыткам создания альтернативных препаратов, имеющих в качестве комплексообразователя двухвалентную платину – и здесь задача состоит в конструировании соединений с разнообразными лигандами.

При лечении цисплатин вводится внутривенно в виде инъекций. Препарат используется для излечения различных видов рака, в том числе саркомы, некоторых карцином (например, мелкоклеточного рака легких и рака яичников), лимфомы и опухолей зародышевых клеток. [11] Цисплатин особенно эффективен против рака яичек; при его применении шансы на излечение возрастают с 10% до 85%.

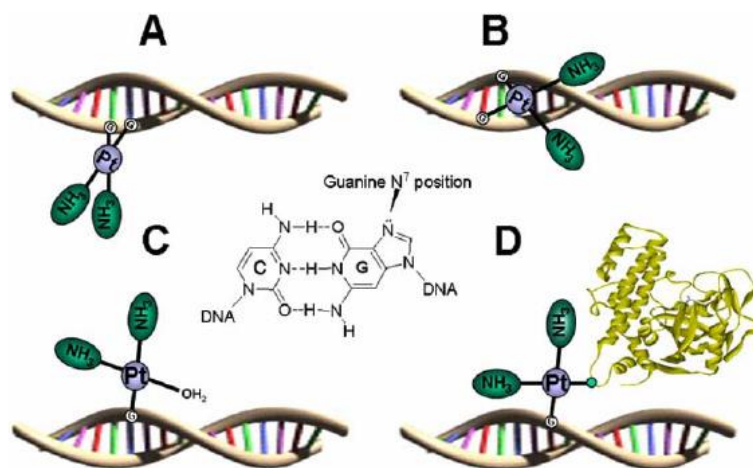


Рис. 1.3.2 Главные аддукты, образовавшиеся после связывания цис-ДДП и ДНК

Как уже говорилось ранее, цисплатин показывает хорошие результаты при лечении разных видов опухолей. Но, несмотря на данное достижение, имеется ряд негативных последствий после приема данного медикамента:

- Нефротоксичность – является основным побочным эффектом. Препарат оказывает токсическое действие на почки, схожее с эффектом тяжелых металлов;
- Нейротоксичность;
- Ототоксичность;
- Тошнота и рвота. [12]



Рис.1.3.3 Цисплатин и его транс-изомер трансплатин

Надо отметить, что трансплатин, являющийся изомером цисплатина (они отличаются только порядком расположения лигандов), не обладает такими же свойствами при взаимодействии с молекулой ДНК как цис-ДДП. Трансплатин не является противоопухолевым препаратом. [13]

С 1971 года было синтезировано второе поколение платиновых комплексов, которое было подвергнуто клиническим испытаниям. К нему можно отнести карбоплатин, оксалиплатин. Важно отметить, что в сравнении с обычно используемыми Pt(II) соединениями (цисплатином и оксалиплатином) недавно найденные комплексы, содержащие Pt(IV) (сатраплатин), оказывается, имеют ряд преимуществ:

- они более безопасны;
- могут быть использованы перорально;
- показывают высокий противоопухолевый эффект. [14]

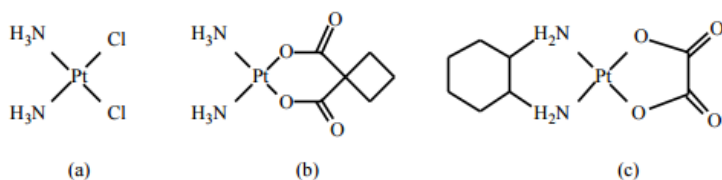


Рис 1.3.4 Платиновые противоопухолевые препараты: (а) цисплатин, (b) карбоплатин, (с) оксалиплатин

Задача данной работы – проверить взаимодействие ДНК с препаратами, состоящими из иона двухвалентного палладия и платины в качестве координационного центра.

#### 1.4 Исследуемые координационные соединения платины и палладия

Данная работа посвящена изучению механизмов связывания двух координационных соединений платины и палладия с молекулой ДНК в водно-солевом растворе.

Для исследования были взяты два препарата на основе платины – KM789 и палладия – KM788. Оба были синтезированы к.х.н. Серебрянской на кафедре ФОХ Института химии СПбГУ.

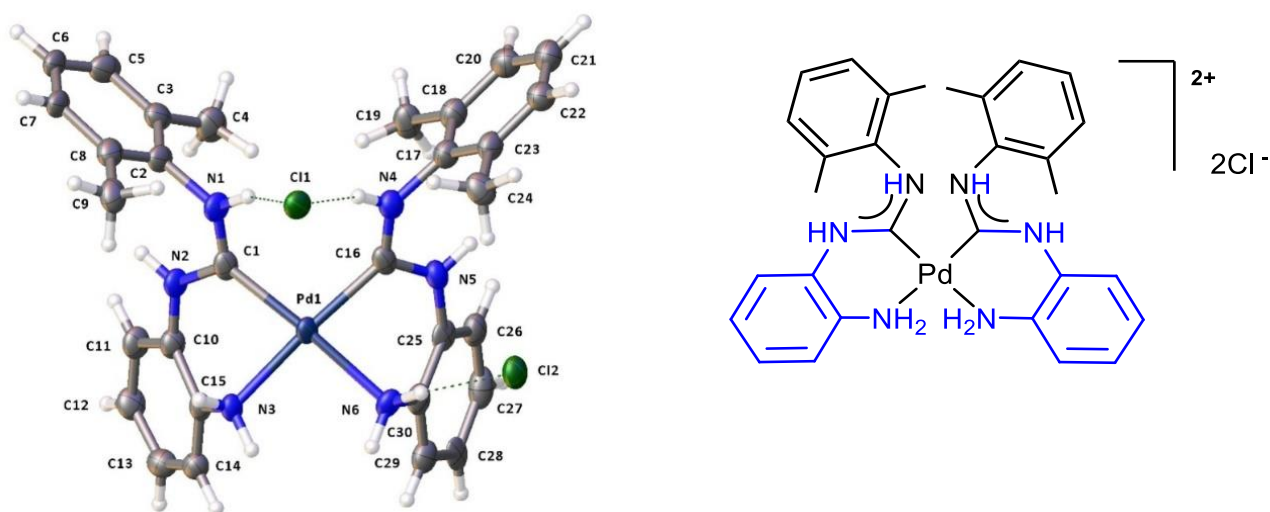


Рис. 1.4.1 Соединение KM788

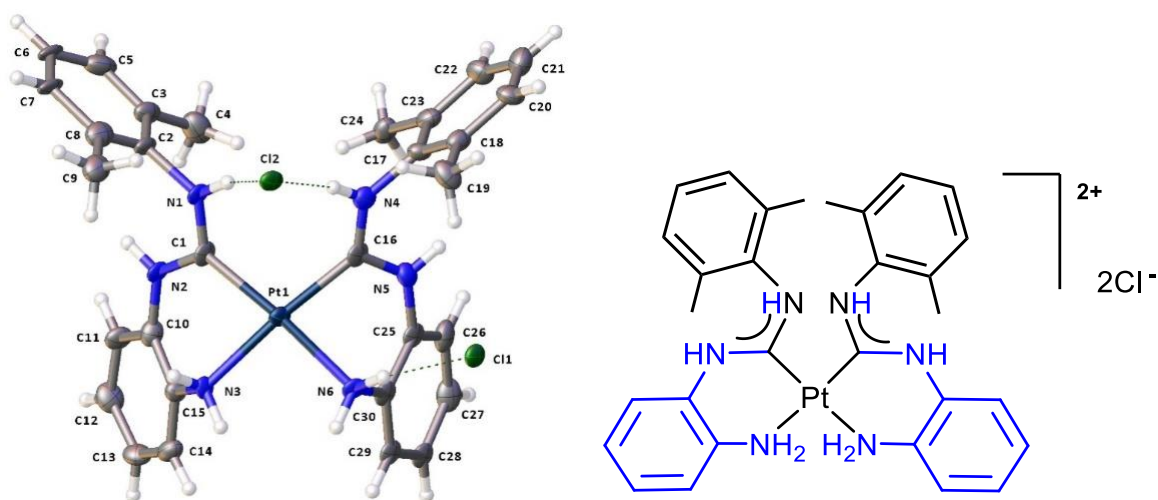


Рис. 1.4.2 Соединение KM789

## Глава 2.

### Методы и материалы

#### 2.1 УФ-спектрофотометрия

Спектры поглощения исследуемых препаратов и их комплексов с ДНК изучали с помощью спектрофотометра СФ-56 (Россия). Для этого были использованы кварцевые кюветы с длиной оптического пути 1 см и 1 мм.

При прохождении излучения через раствор, находящийся в кювете спектрофотометра, приемник улавливает не всю энергию излучателя. Ослабление интенсивности светового пучка при прохождении через исследуемый раствор определяется экстинкцией (молярным поглощением) вещества. Спектрофотометрическим методом можно количественно определить оптическую плотность среды, через которую прошел свет. Согласно закону Бугера-Ламберта-Бэра она выражается как:

$$D = \lg \frac{I_0}{I} = Cl\varepsilon$$

Здесь  $l$  – длина оптического пути,  $C$  – концентрация соединения,  $\varepsilon$  – коэффициент молярной экстинкции, который индивидуален для каждого вещества,  $D$  – оптическая плотность,  $I_0$  — интенсивность исходного излучения;  $I$  — интенсивность излучения, прошедшего через раствор. [15]

Как известно, каждое вещество состоит из атомов, обладающих определенным набором энергетических уровней. Переход электронов с уровня на уровень и определяет длину волны поглощения (или испускания). Поглощение энергии происходит, если поглощенная энергия отвечает разности энергий двух квантовых состояний (двух уровней), а именно, свет с длиной волны  $\lambda$  поглощается, когда

$$\lambda = \frac{hc}{E_2 - E_1},$$

где  $E_1$ - энергетический уровень молекулы до поглощения, а  $E_2$ - энергетический уровень, достигаемый за счет поглощения.

В зависимости от орбиталей, электронные переходы бывают нескольких типов. [16] Можно отметить молекулярные орбитали  $\sigma$  и  $\pi$ -типа. Они, в свою очередь, могут быть связывающими  $\sigma$  и  $\pi$  (с объединением атомов) и разрыхляющими  $\sigma^*$  или  $\pi^*$  (с разъединением атомов). При поглощении света происходит переход со связывающей  $\sigma$  или  $\pi$  орбитали на разрыхляющую ( $\sigma^*$  или  $\pi^*$ ), которые называют  $\sigma$ - $\sigma^*$  и  $\pi$ - $\pi^*$  переходы, соответственно. При этом первые переходы соответствуют поглощению в УФ области спектра ( $< 190$  нм), которая обычно не используется в

спектрофотометрии биополимеров из-за существенного вклада воды и необходимости использовать вакуум в процессе исследований. Наиболее значимыми в области длин волн более 190 нм являются  $\pi$ - $\pi^*$  и  $n$ - $\pi^*$  переходы (последние – с атомных орбиталей на разрыхляющие молекулярные дают малоинтенсивные полосы в рассматриваемой области длин волн).

Действительно, электроны, не участвующие в образовании химических связей неподелённых пар ( $2s^2$  у азота, например), образуют несвязывающие  $n$ -орбитали. Энергия неподеленной пары электронов в молекуле равна её энергии в изолированном атоме. Несвязывающие  $n$ -орбитали локализованы на отдельных атомах, тогда как  $\sigma$  и  $\pi$ -орбитали обычно распространяются на два или более атома в молекуле.

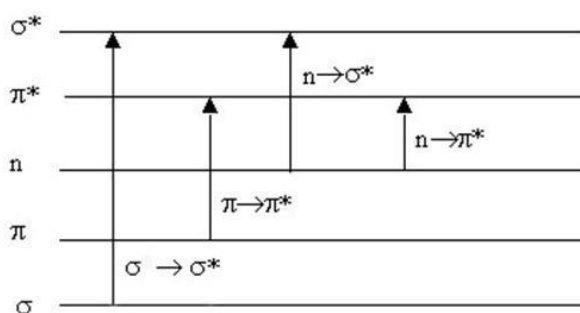


Рис. 2.1.1 Типы электронных переходов.

Как показано на рис. 2.1.1, уровень  $n$  несвязывающей орбитали лежит выше уровней связывающих  $\sigma$  и  $\pi$ -орбиталей. В основном состоянии  $\sigma$ ,  $\pi$  и  $n$  орбитали обычно заняты электронами, а  $\sigma^*$  и  $\pi^*$  орбитали свободны. В результате переходов с занятых орбиталей на свободные происходит поглощение света. Наибольшей энергии требует  $\sigma$ - $\sigma^*$  переход, характерный для насыщенных молекул и соответствующих поглощению в вакуумном ультрафиолете ( $\lambda < 190$  нм). Переходы  $\pi$ - $\pi^*$  происходят в молекулах с сопряженными связями и в ароматических молекулах, они связаны с поглощением в видимой области или ближнем ультрафиолете. Переходы  $n$ - $\sigma^*$  и  $n$ - $\pi^*$  происходят с участием неподеленной пары электронов гетероатомов азота и кислорода. Для биологических макромолекул типичны переходы в УФ области спектра.

Макромолекулы состоят из отдельных составных элементов – хромофоров, которые обладают индивидуальными спектральными характеристиками. Суммарное поглощение хромофоров, содержащихся в молекуле, в результате дает наблюдаемый спектр. Надо отметить, что в биополимерах содержание хромофорных групп высоко. Поэтому максимум поглощения молекулы ДНК совпадает с максимумом усредненного спектра поглощения отдельных оснований ( $\lambda = 260$  нм).

Для двуспиральной ДНК из-за стэкинга оснований наблюдается гипохромизм: двуспиральные полинуклеотиды и нуклеиновые кислоты поглощают меньше в расчете на нуклеотид, чем поглощает просто сумма составляющих их нуклеотидов. Таким образом, природная двуспиральная ДНК поглощает меньше единиц интенсивности из расчёта на один нуклеотид из-за стэкинг-взаимодействия оснований в стопке, чем денатурированная нить ДНК, это и есть гипохромизм. Оценивая степень гиперхромизма при нагревании, можно определить степень денатурации ДНК.

## 2.2 Низкоградиентная вискозиметрия

Как известно, с помощью спектральных методов можно оценить влияние биологически активного препарата на вторичную структуру ДНК. А для оценки результата взаимодействия препарата с ДНК на уровне ее третичной структуры принято использовать гидродинамические методы. В данной работе подобным методом является низкоградиентная вискозиметрия – измерения вязкости растворов полимеров. Для определения вязкости был использован вискозиметр типа Зимма-Крозерса. Он представляет собой два коаксиальных стеклянных цилиндра – статор, в котором размещена исследуемая жидкость, и свободно плавающий в этой жидкости ротор. Благодаря металлическому диску, ротор приводится во вращение при включении магнитного поля. Вследствие внутреннего трения, жидкость приводится во вращение. Отслеживаемая скорость вращения ротора (время оборота ротора в растворе и растворителе) позволяет определить относительную вязкость раствора (скорость вращения ротора обратно пропорциональна вязкости).

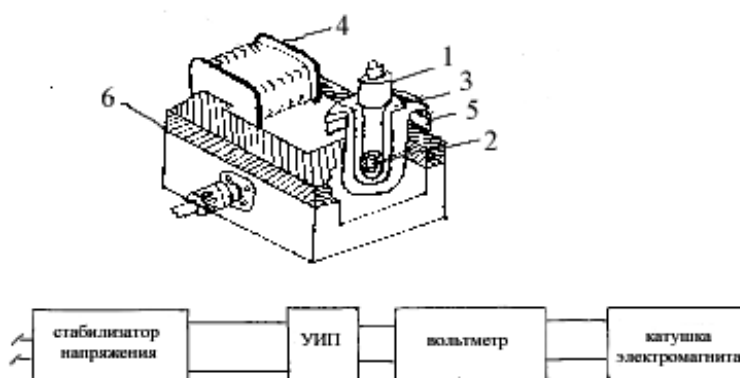


Рис. 2.2.2. Магнитный ротационный вискозиметр. 1 - статор, 2-ротор, 3 - термостатируемая рубашка, 4 - катушка электромагнита, 5 - держатель термостатируемой рубашки, 6 - сердечник катушки

Величина относительной вязкости определяется соотношением:

$$\eta_r = \frac{\tau}{\tau_0},$$

где  $\tau$  - время одного оборота ротора в растворе, а  $\tau_0$  – в растворителе. В работе использовали градиенты скорости в диапазоне  $g = (0,4 \div 2,0) \text{ c}^{-1}$ . Градиент скорости определяется по формуле:

$$g = \frac{\pi}{\tau} \frac{8R_1^2 R_2^2}{(R_1 + R_2)^2 (R_1 - R_2)^2} \ln \frac{R_1}{R_2},$$

где  $R_1$  - внутренний радиус статора - внешнего цилиндра,  $R_2$  - внешний радиус ротора,  $\tau$  - время одного оборота в исследуемом растворе.

Также вычисляется удельная  $\eta_r - 1$  и приведенная  $(\eta_r - 1)/C$  вязкость раствора, где  $C$  – концентрация ДНК в растворе.

Величина характеристической вязкости определяется через экстраполяцию к нулевой концентрации ДНК зависимости приведенной вязкости раствора от концентрации ДНК:

$$[\eta] = \lim_{\substack{g \rightarrow 0 \\ C \rightarrow 0}} \left( \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0 C} \right) = \lim_{\substack{g \rightarrow 0 \\ C \rightarrow 0}} \left( \frac{\eta_r - 1}{C} \right),$$

где  $\eta$  и  $\eta_0$  - вязкости раствора и растворителя,  $C$  — концентрация раствора,  $\eta_r$  — его относительная вязкость. [17]

### 2.3 Плавление ДНК

При нагревании нуклеиновых кислот до определенной температуры (температуры плавления) происходит их денатурация. Этот процесс характеризуется разрушением вторичной упорядоченной структуры ДНК или двуспиральных участков (РНК). Денатурация нативной ДНК приводит к разделению двойной спирали путем разрыва водородных связей и образованию разделенных одноцепочечных комплементарных нитей, которые, в свою очередь, сворачиваются в статистические клубки. В результате данного процесса уменьшается вязкость раствора ДНК и проявляется гиперхромизм, то есть увеличение интенсивности поглощения в области 260 нм. Плавление двойной спирали ДНК, как и в случае  $\alpha$ -спирали белков, представляет собой не фазовый переход I рода, а кооперативное конформационное превращение. [3]

Температурой плавления называют температуру, при которой стэкинг половины пар оснований нарушен. При заданном составе растворителя температура плавления линейно зависит



от количества GT-пар в молекуле ДНК. Кроме того, при изменении таких факторов, как ионная сила раствора ДНК, pH, содержание GT-пар, возможно изменить температуру плавления. [18]

Добавляя в водный раствор ДНК низкомолекулярные вещества (металлы, красители), а также белки, эти молекулы могут связываться с ДНК и укреплять связь между нитями двойной спирали. В результате чего, кривая плавления сдвигается в область более высоких температур (и иногда уширяется. Теория плавления ДНК и перехода спираль – клубок была хорошо изучена российскими учеными. [19]

В этой работе эксперименты по плавлению ДНК производились на приборе Specord 200+.

## 2.4 Люминесценция

Спектрофлуориметр - спектральный прибор, предназначенный для измерений спектров люминесценции. Данный прибор состоит из двух работающих независимо монохроматоров. Первый служит для выделения из сплошного спектра излучения источника выбранных спектральных интервалов, необходимых для возбуждения фотолюминесценции в исследуемом образце. Второй монохроматор регистрирует непосредственно люминесценцию, наблюдаемую в направлении, перпендикулярном освещению, и отправляет этот спектр на соответствующий приемник («измерительный» канал). С помощью светоделителя часть возбуждающего излучения, выделенного первым монохроматором, направляется в «опорный» канал со своим приёмником. В блоке регистрации осуществляется фотометрирование, после чего измеряется отношение сигналов в измерительном и опорном каналах. При работе данного устройства применяются два основных режима: измерение спектра люминесценции для выбранной длины волны возбуждающего излучения (первый монохроматор зафиксирован, а сканирование происходит вторым монохроматором) и измерение спектра возбуждения для данной длины волны люминесценции (теперь наоборот сканирование осуществляется первым монохроматором при фиксированной настройке второго).

В работе использовали люминесцентный спектрофотометр Hitachi 850.

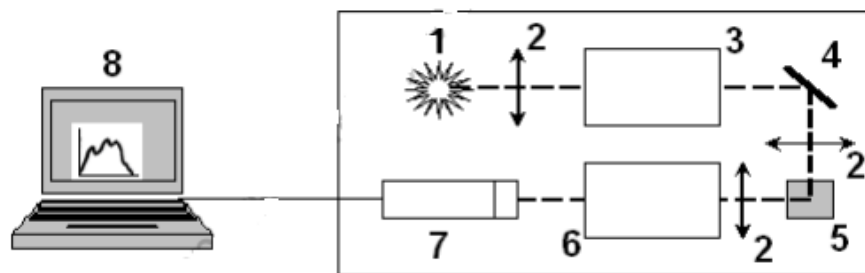


Рис.2.4.1 Блок-схема спектрофлуориметра. 1-источник возбуждения, 2-линзы, 3 и 6- монохроматоры, 4- поворотное зеркало, 5- кювета с образцом, 7-ФЭУ, 8-система вывода данных.

## 2.5 Материалы

В работе использовались:

- Координационные соединения KM789 (Pt bis Xyl) и KM788 (Pd bis Xyl), синтезированные на кафедре ФОХ Института химии СПбГУ.
- Высокомолекулярная ДНК тимуса телёнка «Sigma-Aldrich» (в виде натриевой соли) с молекулярной массой  $M=10$  МДа, определённой по значению характеристической вязкости в 0,15 М растворе NaCl.
- Лабораторная вода Millipore Type I, полученная из РЦ ДФМ НП СПбГУ.
- Соль NaCl марки «х.ч».
- Цисплатин и трансплатин.

## Глава 3.

### Результаты и их обсуждение.

#### 3.1 Конкурентное связывание.

Для исследования взаимодействия ДНК с координационными соединениями использовали водно-солевые растворы ДНК, содержащие исследуемые соединения. В качестве растворителя использовали NaCl. Все эксперименты проводили при ионной силе раствора 0,005 М.

Сведения о позиции связывания изучаемых соединений с ДНК может дать следующий эксперимент. Исследование конкурентного связывания новых химических веществ и известных препаратов, места связывания которых с ДНК хорошо известны, может прояснить тип взаимодействия и сайтов связывания новых препаратов.

На рис. 3.1.1 представлены спектры поглощения ДНК при взаимодействии с препаратом KM788 до и после связывания цисплатина с молекулой ДНК. Можно видеть, что цисплатин и KM788 вызывают схожие изменения в полосе поглощения ДНК. Следует подчеркнуть, что цисплатин не поглощает при длине волны  $\lambda > 255$  нм. Напротив, поглощение соединения KM788 наблюдается в том же спектральном диапазоне, что и у ДНК за счет присутствия в его составе ароматических лигандов (рис. 3.1.1 а). В связи с этим мы вычислили спектры поглощения ДНК в комплексах и нормировали их на поглощение при 260 нм (рис. 3.1.1 б). Интересно, что добавление цисплатина к раствору, содержащему аддукты ДНК-KM788, вызывает дополнительный bathochromный сдвиг, точно так же проявляющийся при добавлении соединения KM788 к растворам с аддуктами ДНК-цисплатин. Известно, что ДНК содержит около 43% пар оснований GC. Концентрация ДНК в эксперименте ( $4,5 \times 10^{-5}$  М нуклеотидов, что обеспечивает  $r = 0,55$ , где  $r$  - отношение молярных концентраций соединения и пар оснований ДНК в растворе 0,005 М NaCl) дает достаточное количество сайтов связывания на ДНК. В то же время, для цисплатина заполнение сайтов связывания происходит при  $r > 0,8$ . Основываясь на данных результатах можно заключить, что оба соединения взаимодействуют с ДНК по одним и тем же сайтам, потому что добавление второго соединения в раствор с начальными аддуктами производит большие спектральные изменения. Так как цисплатин связывается с N7 гуанина, наше соединение, содержащее палладий, также взаимодействует с этой позицией, находящейся в большой бороздке ДНК.

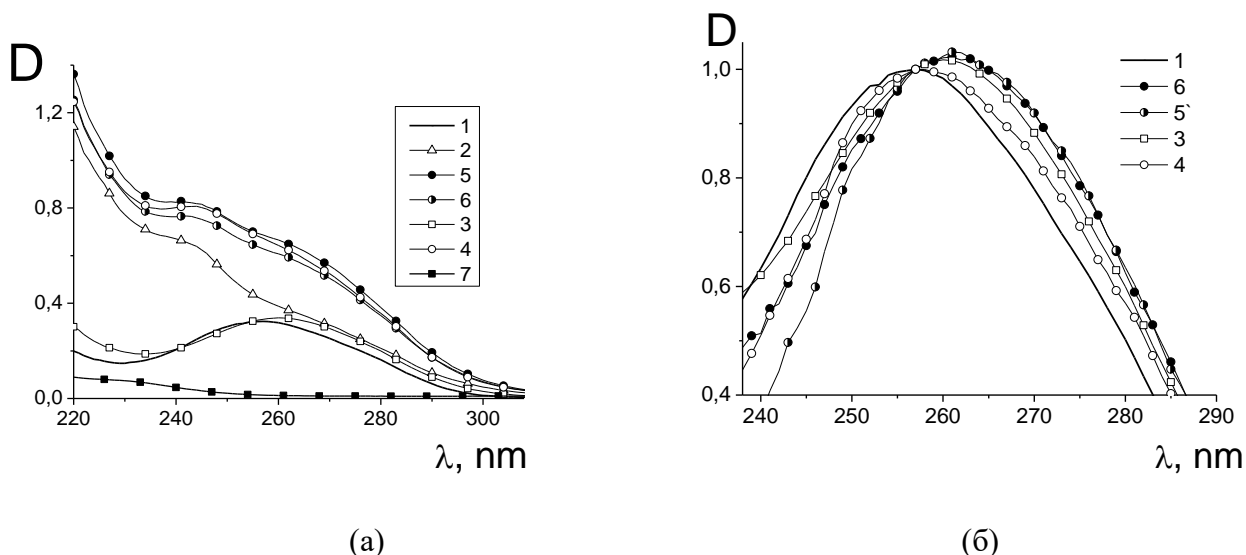


Рис. 3.1.1 Спектры поглощения (а) и нормированные спектры поглощения (б). свободной ДНК (1), KM788 (2), аддуктов ДНК-цисплатин (3), ДНК-KM788 (4), ДНК-цисплатин после добавления KM788 (5) и ДНК-KM788 после добавления цисплатина (6). Приведен также спектр поглощения цисплатина (7).  $C(\text{KM788}) = C(\text{цисплатин}) = 2,5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ .

Результаты, полученные в подобном эксперименте с участием трансплатина (транс-ДДП) представлены на рис. 3.1.2. Видно, что первый аддукт определяет тип спектральных изменений в тройных системах. Небольшой гипсохромный сдвиг спектральной полосы ДНК после добавления транс-ДДП к аддуктам ДНК с KM788 не может быть связан с изменением вторичной структуры макромолекулы и, по-видимому, отражает спектральные изменения хромофоров KM788 при связывании. Можно заключить, что связывание транс-ДДП с ДНК отличается от связывания с платино- и палладий-содержащими соединениями.

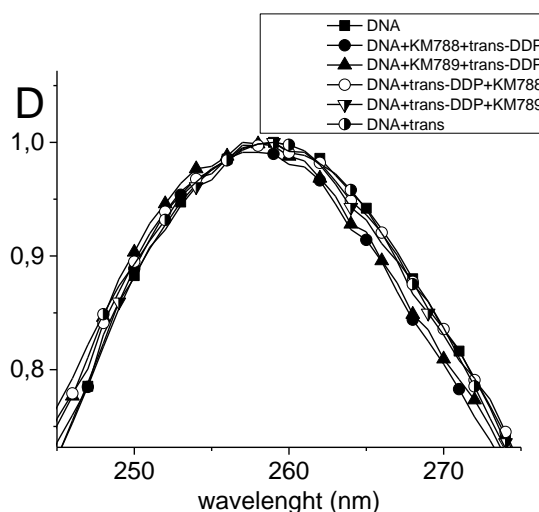
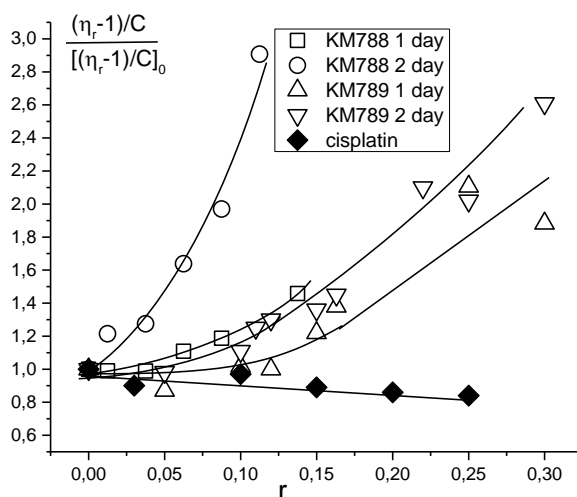


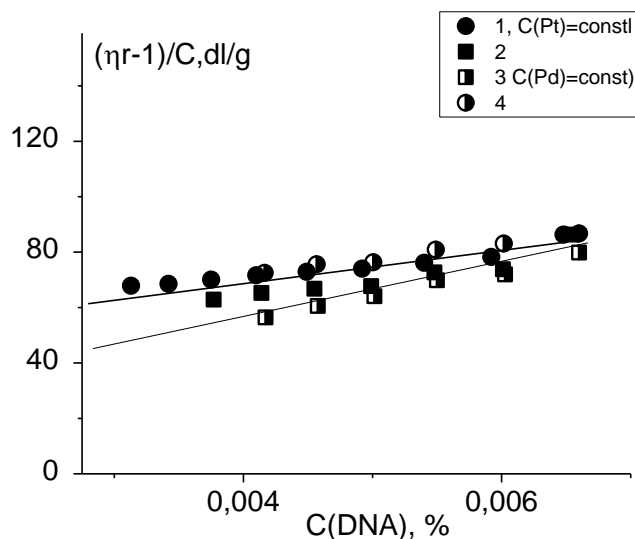
Рис. 3.1.2 Результаты исследования тройных систем ДНК+транс-ДДП+новое соединение.

### 3.2 Гидродинамический метод.

Для оценки влияния связывания на третичную структуру молекулы ДНК было применено вискозиметрическое титрование. Известно, что снижение приведенной вязкости растворов ДНК при одной и той же концентрации ДНК и изменяющихся концентрациях рассматриваемых соединений отражает сокращение объема молекулярного клубка и может быть связано с сокращением персистентной длины посредством связывания. На рис.3.2.1 возрастание значений вязкости указывает на увеличение объема ДНК и может быть объяснено интеркаляцией лигандов из координационной сферы соединений КМ788 и КМ789 между основаниями ДНК. Однако, подобное огромное увеличение вязкости не может быть вызвано только этой причиной. Действительно, принцип исключенного соседа для модели интеркаляции позволяет это значение увеличить всего на 25-30%. Можно предположить и значительное возрастание жесткости ДНК. Кроме того, вероятно, что при использованной концентрации ДНК и соединений ( $2 \times 10^{-4}$  М нуклеотидов и приблизительно  $10^{-5}$  М для КМ788 или КМ789) надмолекулярные структуры образуются в растворе за счет одновременного, связывания одного координационного соединения с двумя молекулами ДНК. Этот эффект наиболее значителен для КМ788, особенно после хранения раствора с аддуктами в течение 1 дня в холодильнике при температуре  $4^{\circ}$  С. Кроме того, соединение КМ788 вызывает увеличение приведенной вязкости раствора ДНК при более низких концентрациях, чем КМ789.



(1)



(2)

Рис.3.2.1 Зависимость относительного изменения удельной вязкости (I) растворов ДНК после связывания с КМ788 и КМ789. Измерения проведены сразу после смешивания растворов 1 ДНК и соединений и на следующий день 2. (2): Зависимости приведенной вязкости растворов при постоянной концентрации соединений от концентрации ДНК при разных способах разбавления.

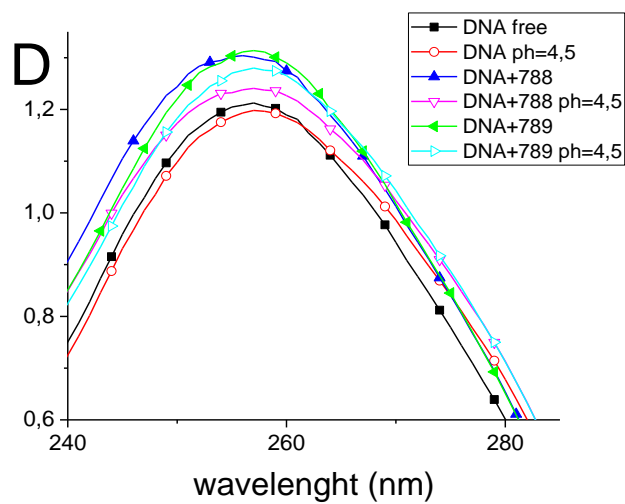
Таким образом, результаты данного метода отображают значительное увеличение вязкости раствора, вызванное конформационными изменениями в ДНК или за счет появления надмолекулярных структур в растворах ДНК при добавлении соединений КМ788 и КМ789. С другой стороны, целый набор спектральных данных указывает на схожесть связывания с ДНК соединений КМ788, КМ789 и цисплатина.

Следующий эксперимент с исследованием вязкости растворов был произведен для выяснения предпочтительного способа связывания наших препаратов с молекулой ДНК. Он основывается на предположении, что координационное связывание происходит значительно медленнее нежели другие типы взаимодействия, такие как интеркаляция или электростатическое связывание. Именно поэтому зависимость приведенной вязкости растворов ДНК с комплексами, измеренная при разных способах разбавления, приводящих к нарушению равновесия между связанной и свободной фракциями препаратов в растворе ДНК, должна совпадать при образовании преимущественно координационных связей в растворе. Эта методика может быть использована для различия быстрого и медленного типов взаимодействия. Два альтернативных метода разбавления исходного раствора с аддуктами (ДНК-КМ788 или ДНК-КМ789) были применены для

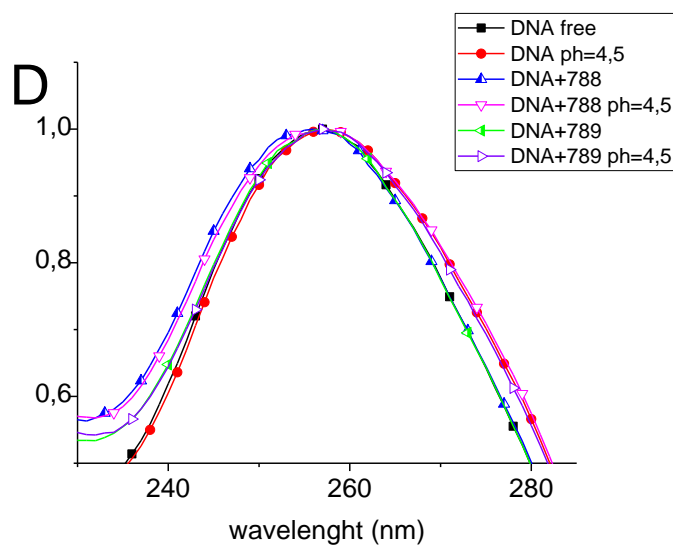
определения характеристической вязкости ДНК в результате экстраполяции зависимости приведенной вязкости от концентрации ДНК к  $C(\text{ДНК}) = 0$ . Первый метод подразумевал постоянное значение  $\eta$ . Второй проводился при постоянной концентрации соединений платины и палладия в растворах ДНК. Как следует из рис.3.2.1.2, в случае с КМ789 оба метода отображают схожие результаты экстраполяции (связанная фракция не изменяется в эксперименте). Данный результат указывает на то, что КМ789 связывается с ДНК преимущественно через координационную связь. Действительно, образование платиной координационной связи с ДНК может занимать более чем 4 часа в растворе при комнатной температуре. В случае с препаратом палладия разница между двумя типами разбавления заметна. Это показывает, что Pd-комплекс взаимодействует с ДНК намного быстрее, чем его родственное соединение на основе Pt. И во время эксперимента (около 3 часов при комнатной температуре) наблюдается реорганизация аддуктов ДНК-Pd. Этот результат может быть объяснен либо более быстрой кинетикой обмена лигандов Pd-частиц, либо преобладанием некоординирующих режимов связывания. Принимая во внимание результаты спектральных исследований УФ, мы склоняемся к первой причине.

### 3.3 Протонирование ДНК в комплексах с препаратами платины.

Протонирование ДНК наблюдается в 0,005 М NaCl за счет присоединения протона в N7-гуанина ( $pK = 4,75$ ). На первом этапе протонирования при понижении pH можно видеть гипохромный эффект без разрушения двухцепочечной структуры ДНК с небольшим bathochromным сдвигом для полосы поглощения ДНК. Аналогичные изменения наблюдаются для аддуктов ДНК-КМ788 и ДНК-КМ789. Это затрудняет интерпретацию спектральных данных. В то же время, в этом эксперименте высокая концентрация ДНК ( $1,8 \times 10^{-4}$  М нуклеотидов) и низкая концентрация соединений  $7 \times 10^{-6}$  М (их было только 8 молекул на 100 пар оснований) обеспечивали заполнение лишь небольшого числа сайтов связывания (N7G), оставляя возможность для протонирования ДНК. Действительно, вискозиметрические данные, без всякого сомнения, показывают, что протонирование ДНК (появление положительных зарядов на отрицательно заряженной ДНК) действительно вызывает поджимание клубка ДНК. Хотя снижение вязкости меньше при образовании аддуктов с препаратами, особенно при использовании комплекса КМ789. Это однозначно указывает на координационные связи платины и палладия в аддуктах с участием N7 гуанина – главного протон-акцепторного центра двуспиральной ДНК.



(A)



(Б)

Рис.3.3.1 Спектры поглощения растворов ДНК, ДНК-КМ788 и ДНК-КМ789 при нейтральных рН и рН=4.5 до (А) и после (Б) измерения вязкости.



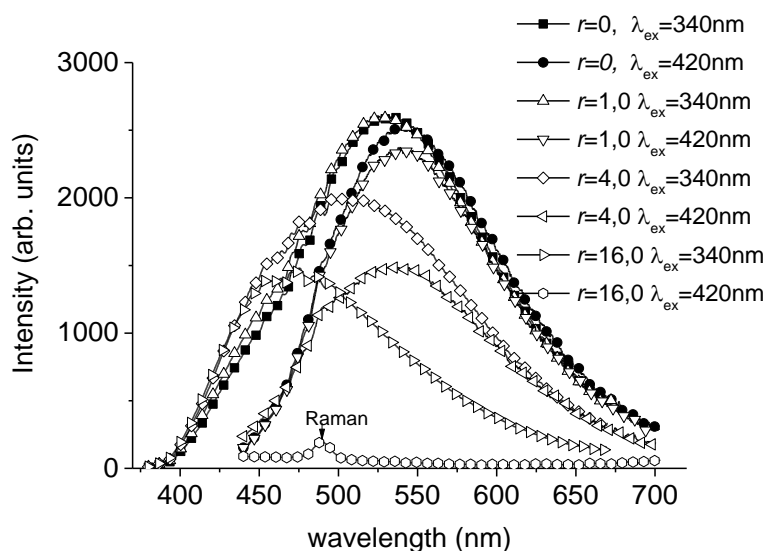
Таблица1. Результат протонирования ДНК в 0,005 М NaCl после связывания с соединениями.

pH	7.5	5.5	4.5	
	Приведенная вязкость растворов ДНК с аддуктами ДНК-КМ788 (КМ789) (в дл/г)			Относительное изменение вязкости при pH=4.5 (приведено к значению при pH=5.5 )
DNA	$86 \pm 1$	$85 \pm 1$	$58 \pm 1$	0,68
DNA+ КМ788		$111 \pm 2$	$87 \pm 1$	0.78
DNA + КМ789		$93 \pm 1$	$89 \pm 1$	0.96

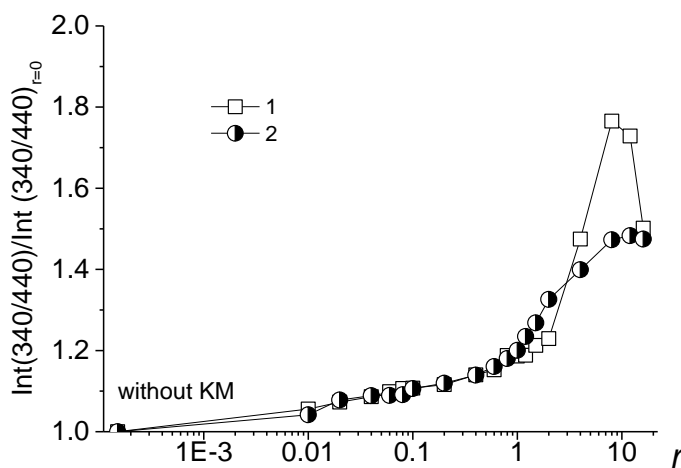
### 3.4 Флуоресценция красителя DAPI в растворах ДНК с препаратами.

Анализ влияния связывания соединений с ДНК на люминисценцию красителя DAPI в комплексах с ДНК, также позволяет обнаружить места связывания КМ788 и КМ789. При взаимодействии с ДНК у DAPI проявляется два типа связывания, хорошо различимых при изучении флуоресценции красителя в растворе ДНК. Первый тип связывания красителя с ДНК с высоким квантовым выходом люминисценции, проявляющийся при малых отношениях  $C(\text{DAPI})/C(\text{ДНК})$  (молярных концентраций красителя и фосфатных групп ДНК, далее обозначено как  $z$ )  $z < 0.05$  соответствует сильному связыванию красителя по малой бороздке с частичной интеркаляцией DAPI между основаниями. Для наблюдения данного вида связывания была рассмотрена люминесценция при  $\lambda_{\text{em}} = 440$  нм при возбуждении в максимуме полосы поглощения красителя  $\lambda_{\text{ex}} = 340$  нм. Другой тип связывания происходит посредством внешнего электростатического взаимодействия DAPI по фосфатным группам при постоянном значении  $z=0.3$  и разных соотношениях концентраций исследуемых соединений КМ788 и КМ789 к концентрации ДНК ( $r$ ). Данное взаимодействие проявляется через слабую люминесценцию при длинах волн  $\lambda_{\text{ex}} = 420$  нм и  $\lambda_{\text{em}} = 540$  нм. DAPI был добавлен к комплексам ДНК-КМ788 (или ДНК-КМ789) на следующие сутки после смешивания растворов, после чего проводились измерения. Форма и интенсивность спектров излучения комплексов DAPI-ДНК определяются концентрацией

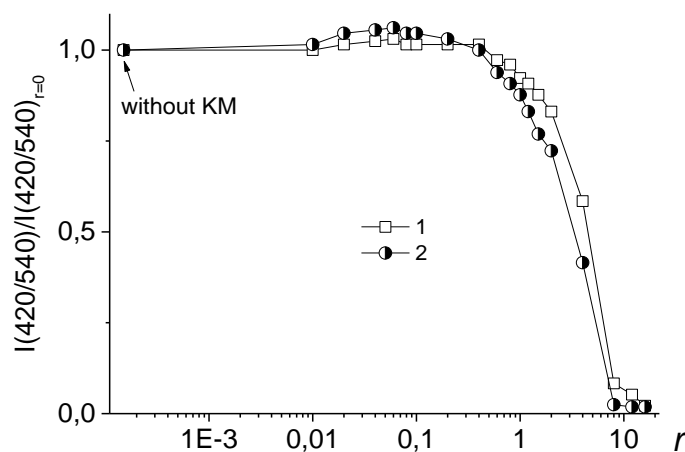
исследуемых препаратов в растворе ДНК (рис.3.4.1.А). КМ788 и КМ789 демонстрируют аналогичное влияние на люминесценцию DAPI. При увеличении  $r$  вклад связавшихся в малой бороздке ДНК молекул DAPI в спектр излучения при  $\lambda_{\text{ex}} = 340$  нм повышается (рис.3.4.1.Б). Напротив, интенсивность спектра излучения при  $\lambda_{\text{ex}} = 420$  нм, индуцированная электростатическим связыванием DAPI с фосфатами, уменьшается (рис.3.4.1 В). Как видно из рис. 3.4.1.Б и В, наиболее значительные изменения интенсивности происходят при  $r > 1$ .



(А)



(Б)

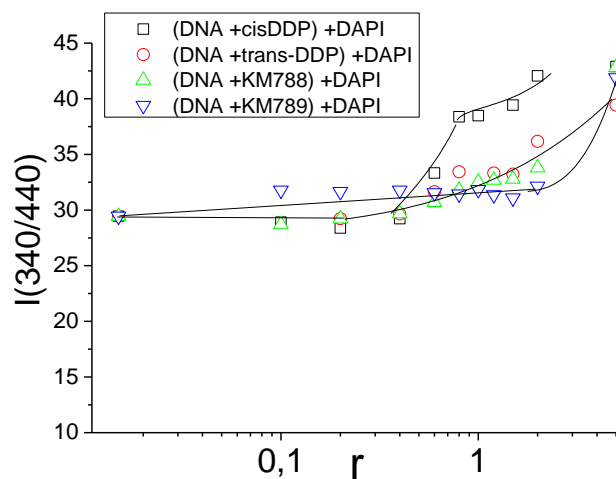


(B)

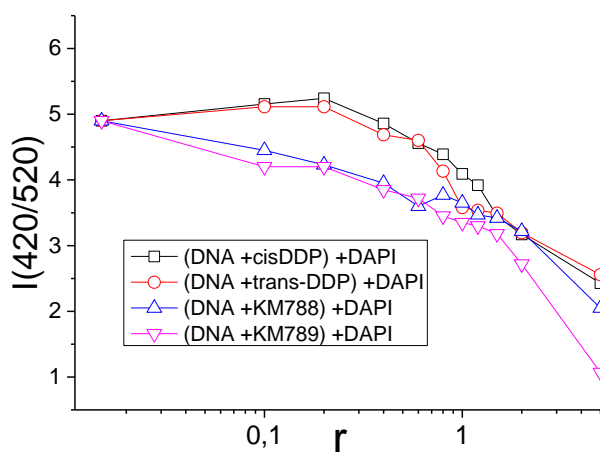
Рис.3.4.1 (А). Спектры флюорисценции DAPI ( $\lambda_{ex} = 340$  нм и  $\lambda_{ex} = 420$  нм) в водных ДНК-содержащих растворах при различной концентрации KM788 ( $r$ -значение). Спектры при  $\lambda_{ex} = 420$  нм были умножены в 12,5 раз. Зависимость относительного изменения интенсивности люминесценции DAPI при  $\lambda_{ex} = 340$  нм,  $\lambda_{em} = 440$  нм (Б) и при  $\lambda_{ex} = 420$  нм,  $\lambda_{em} = 540$  нм от значения  $r$  для KM788 (1) и KM789 (2). (Б)  $C(\text{DAPI}) = 5 \times 10^{-6}$  M = const,  $C(\text{ДНК}) = 1,5 \times 10^{-5}$  M(P) = const.

Основываясь на полученных данных, можно предположить, что KM788 и KM789 не располагаются в малой бороздке и не препятствуют соответствующему сильному связыванию DAPI. Они связываются с основаниями ДНК по большой бороздке, и, возможно, это связывание трансформирует малую бороздку, делая ее более доступной для DAPI. При высоком значении  $r$  ( $r > 1$ ) наблюдается конкуренция между соединениями DAPI и соединениями КМ за связывание с фосфатными группами. Таким образом, при  $r < 1$  DAPI и KM788 (KM789) находят возможность связываться с ДНК независимо (главным образом, в малых и больших бороздках), тогда как при  $r > 1$  молекулы наших препаратов вытесняют краситель с фосфатных групп.

Для сравнения рассмотрим результаты аналогичных экспериментов с использованием цисплатина и его неактивного транс-аналога (рис. 3.4.2).



(А)



(Б)

Рис. 3.4.2 Зависимости интенсивности флуоресценции DAPI в водных ДНК-содержащих растворах с добавлением различных координационных соединений (цис-DDP, транс-DDP, KM788, KM789) при разных соотношениях концентраций лигандов к концентрации ДНК.

$C_{\text{DAPI}} = 9 \cdot 10^{-6} \text{ M} = \text{const}$ ,  $C_{\text{DNA}} = 1,5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$  (по фосфатам) = const. (А):  $\lambda_{\text{ex}} = 340 \text{ нм}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 440 \text{ нм}$ ;

(Б):  $\lambda_{\text{ex}} = 420 \text{ нм}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 540 \text{ нм}$ .

Для первого (сильного) типа связывания красителя DAPI с ДНК в малой бороздке (рис. 3.4.2 (А)  $\lambda_{ex}=340$  нм) происходит увеличение интенсивности люминесценции при добавлении всех четырех исследуемых лигандов. Кривая цис-ДДП отличается от остальных более ранним (при меньших  $r$ ) увеличением интенсивности люминесценции DAPI. Вероятнее всего, взаимодействие цис-ДДП при малых концентрациях с основаниями ДНК (внутрицепные сшивки с соседними основаниями) не приводит к изменению структуры ДНК и к изменению связывания красителя. При увеличении  $r$  начинает проявляться второй тип связывания (межнитевые сшивки с частичным разрушением водородных связей и локальным раскручиванием двойной спирали), приводящий к увеличению числа сайтов связывания DAPI с ДНК по первому типу (в малой бороздке). Затем наблюдается тенденция к насыщению такого связывания, после чего с дальнейшим увеличением  $r$  снова наблюдается рост люминесценции DAPI в комплексах первого типа. Для остальных соединений однократное увеличение люминесценции наблюдается при больших  $r$ , и оно сходно для КМ препаратов (при  $r>2$ ). Последнее указывает на некую перестройку в структуре ДНК, способствующую дополнительному связыванию DAPI в малой бороздке.

Для второго (электростатического) типа связывания DAPI с фосфатами ДНК (рис. 3.4.2 (Б)  $\lambda_{ex}=420$  нм) наблюдается постепенное тушение люминесценции при добавлении в раствор исследуемых соединений КМ, что указывает на существенную роль связывания этих соединений с фосфатными группами ДНК, тогда как в комплексах с цис- и транс-ДДП при тех же значениях  $r$  люминесценция практически не меняется (они в данных условиях с фосфатами практически не связываются). Одинаковое тушение люминесценции DAPI при  $r>1$  наблюдается при концентрациях КМ 788 немного больших, чем концентрациях КМ789, что, скорее всего, является следствием меньшей константы связывания по фосфатам.

### 3.5 Плавление ДНК.

Наконец, при исследовании плавления ДНК после образования аддуктов с соединениями было показано, что связывание КМ788 и КМ789 с ДНК не приводит к нестабильности двойной спирали. Температура плавления свободной ДНК  $T_m = 66 \pm 1$ , для аддуктов ДНК-КМ788 и ДНК-КМ789 при  $r = 1$   $T_m = 68 \pm 1$  и  $T_m = 67 \pm 1$ . Следовательно, можно сделать вывод, что рассматриваемое связывание не нарушает стабильность двойной спирали.

## Выводы

1. Оба исследуемых соединения КМ788 и КМ789 взаимодействуют с молекулой ДНК по одним и тем же местам связывания, а именно по позиции N7 гуанина – главного протон-акцепторного центра двуспиральной ДНК.
2. Связывание транс- ДДП с ДНК отличается от связывания с платино- и палладий-содержащими соединениями.
3. Посредством вискозиметрического метода было выявлено, что происходит увеличение вязкости растворов ДНК при добавлении соединений КМ788 и КМ789 за счет образования надмолекулярных структур
4. Соединение, содержащее Pd-комплекс, взаимодействует с ДНК намного быстрее, чем его родственное соединение на основе Pt.
5. КМ788 и КМ789 образуют связь с основаниями ДНК по большой бороздке. При высоком значении  $r$  ( $r > 1$ ) наблюдается конкуренция между соединениями DAPI и соединениями КМ за связывание с фосфатными группами. Таким образом, при  $r < 1$  DAPI и КМ788 (КМ789) находят возможность связываться с ДНК независимо (главным образом, в малых и больших бороздках), тогда как при  $r > 1$  молекулы наших препаратов вытесняют краситель с фосфатных групп.
6. При добавлении КМ788 и КМ789 к молекуле ДНК не происходит процесса дестабилизации двойной спирали. Температура плавления свободной ДНК  $T_m = 66 \pm 1$ , для аддуктов ДНК-КМ788 и ДНК-КМ789 при  $r = 1$   $T_m = 68 \pm 1$  и  $T_m = 67 \pm 1$ .

## Глава 4.

### Список литературы

1. М. Вейсман "Рак: все, о чем умолчали врачи", Вектор, 2012
2. J. D. Watson, F. H. C. Crick, A structure of deoxyribose nucleic acid, *Nature*, 1953, 171, 737-738
3. М.В. Волькенштейн, Биофизика, М., Наука, 1988
4. В. Зенгер, Принципы структурной организации нуклеиновых кислот, пер. с англ., М.: Мир, 1987.
5. Глинка Н. Л., Общая химия, М., 1984
6. Barnett Rosenberg, Loretta Van Camp & Thomas Krigas, Inhibition of Cell Division in *Escherichia coli* by Electrolysis Products from a Platinum Electrode, *Nature* 205, 698 - 699 (13 February 1965)
7. Rosenberg B., Van Camp L., Trosko J.E., Mansour V. N., Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents, *Nature*, 1969, 222, 385-386
8. Leng, M., Brabec, V., DNA adducts of cisplatin, transplatin and platinum-intercalating drugs. Hemminki, K., Dipple, A., Shuker, D.E.G., Kadlubar, F.F., Segerbäck, D., Bartsch, H. (Eds.), DNA Adducts: Identification and Biological Significance. International Agency for Research on Cancer, Lyon, 1994, 339–348
9. Sangeetha Gowda K. R., Blessy Baby Mathew, C.N. Sudhamani, H.S. Bhojya Naik, Mechanism of DNA binding and cleavage, *Biomedicine and biotechnology*, 2014, Vol. 2, No. 1, 1-9
10. V. M. Gonzalez, M. A. Fuertes, C. Alonso, J. M. Perez, Is Cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis, *Molecular Pharmacology*, Vol.59, 657-663, 2001
11. B. Rosenberg, Platinum complexes for the treatment of cancer. N.:Y. – 1980. – V.1. – p. 1-29
12. Cepeda V., Fuertes M.A., Castilla J., Alonso C., Quevedo C., Perez J.M., Biochemical Mechanisms of Cisplatin Cytotoxicity Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry, 2007, Vol. 7, No. 1
13. A. Eastman, Comparison of the interaction of cis- and trans-diamminedichloroplatinum(II) with DNA by a simple filter binding assay, *biochemical and biophysical communications*, Vol. 105, No. 3, 1992

14. Mechanisms of effects of platinum (II) and (IV) complexes. Comparison of cisplatin and oxaliplatin with satraplatin and LA-12, new Pt(IV)-based drugs. A MINIREVIEW, SCRIPTA MEDICA (BRNO) – 81 (2): 105–116, June 2008
15. М.В. Волькенштейн, «Молекулярная биофизика», М.: Наука, 1975
16. Миронов И.В., Притчина Е.А., Бейзель Н.Ф., Полякова Е.В. Оптические методы анализа: методическое пособие / Новосиб. гос. ун-т. Новосибирск, 2013. 72 с
17. Сибилёва М. А., Морошкина Е. Б., Руководство к лабораторному практикуму по молекулярной биофизике. СПб.: СПбГУ, 1998
18. Determination of melting temperature and temperature melting range for DNA with multi-peak differential melting curves Dmitri Y. Lando a,b , Alexander S. Fridman a , Chun-Ling Chang b , Inessa E. Grigoryan c , Elena N. Galyuk a , Oleg N. Murashko d , Chun-Chung Chen b , Chin-Kun HuAnalytical Biochemistry 479 (2015) 28–36
19. М. Д. Франк-Каменецкий, А. А. Веденов, А. Дыхне, Плавление молекул ДНК, Успехи физических наук, том. 98, вып. 4, 1969